新型内表面反相限进填料的制备与评价

武晓玉¹, 王 荣^{1,2*}, 谢 华¹, 王剑锋¹, 杨 沛²,
贾正平^{1,2*}, 张 强¹, 王先华¹

(1. 兰州军区兰州总医院全军高原损伤防治重点实验室, 甘肃 兰州 730050;

2. 兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730050)

摘要:通过在硅烷化硅胶内表面和外表面分别键合己胺和聚乙烯醇,制备了能够在线直接进样分析生物样品的新型内表面反相限进填料。采用元素分析、电镜观察对该限进填料的结构进行了表征。以普萘洛尔、阿替洛尔、苯巴比妥、卡马西平作溶质探针,并以 Merck 公司生产的限进填料柱作参比,对合成的限进填料的色谱性能进行了研究。研究表明,所制备的限进填料有较好的蛋白质排阻能力、富集能力和反相色谱性能,能同时实现排阻生物大分子杂质和富集小分子被分析物的功能,可作为在线、快速直接进样检测分析生物样品的预处理柱,适用于普萘洛尔血浆的直接进样分析。

关键词:内表面反相限进填料;制备;评价;高效液相色谱法;普萘洛尔;血浆

中图分类号:O658

文献标识码:A

文章编号:1000-8713(2012)08-0810-06

Preparation and application of internal surface reversed-phase restricted-access material

WU Xiaoyu¹, WANG Rong^{1,2*}, XIE Hua¹, WANG Jianfeng¹, YANG Pei²,
JIA Zhengping^{1,2*}, ZHANG Qiang¹, WANG Xianhua¹

(1. PLA Key Laboratory of the Plateau of the Environmental Damage Control, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Command, Lanzhou 730050, China; 2. School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730050, China)

Abstract: A new convenient synthetic method was developed for the preparation of restricted-access material belonging to the group of the internal surface reversed-phase supports, which can be used for the direct injection and analysis of complex biological samples such as plasma samples. The supports, owning the function of reversed-phase chromatography, have an alkyl-chain only to the internal surfaces of the porous silica. Polyvinyl alcoholic groups chemically bound to the external surfaces of the porous silica that has the ability of hydrophilicity. Its structure was characterized by elemental analysis and electron microscope observation. The reversed-phase chromatographic performance was evaluated by using different solute probes, including propranolol, atenolol, phenobarbital and carbamazepine. Meanwhile, the comparative study with Merck Company's ADS columns was carried out to prove capability of removing protein. At the same time, the plasma sample of propranolol was applied for the determination by direct injections. The results showed that the new internal surface reversed-phase restricted-access material owned the capabilities of protein exclusion and reversed-phase stationary, which could come true the double functions of excluding biomacromolecules and enriching micromolecule analysis. It can be used as a pretreatment column, which has the ability of on-line and fast analyzing biological specimen by direct probe inlet.

Key words: internal surface reversed-phase restricted-access material; preparation; evaluation; high performance liquid chromatography (HPLC); propranolol; plasma samples

* 通讯联系人:王 荣,教授,主要研究方向为药物分析。Tel: (0931)8994675, E-mail: wangrong-69@163.com.

贾正平,教授,博士生导师,主要研究方向为药物分析及分子药理学。Tel: (0931)8994652.

基金项目:科技部重大项目(2008ZXJ09014-010).

收稿日期:2012-03-23

对体内生物样品进行分析时,被分析物的浓度低,内源性干扰大;而传统生物样品前处理方法如蛋白质沉淀法、液-液萃取法、固相萃取法等均有样品用量大、操作步骤繁琐、耗费大量人力和物力、准确度和精密度不高且在离线状态下进行等缺点。因此,制备能够快速、在线分析生物样品的前处理色谱填料具有十分广阔的实际应用前景。在众多的色谱填料中,限进填料(restricted-access material, RAM)是一种新型在线样品预处理填料,它因能够避免被分析物由于前处理所造成的损失,减少传统生物样品制备时的繁琐步骤,节省人力和物力且易于实现自动化等优点^[1,2]而备受关注。

限进填料也称为限制进入固定相,它是一个有许多不同结构类型的填料家族,但均有相似的分离机制。这类填料同时兼具分离和富集功能,通过控制填料的孔径和对其外表面进行亲水性修饰,使得亲水性外表面与生物样品中大分子物质不发生不可逆的变性和吸附,进而在死体积或近于死体积的情况下被洗脱除去;通过对其内表面进行疏水性修饰,使其具有反相色谱性能,小分子被分析物可进入填料内孔,通过疏水作用和静电作用被保留^[3-5]。RAM家族包括内表面反相填料^[6]、烷基二醇基硅胶填料^[7-12]、键合相多孔硅胶填料^[13,14]、半渗透表面填料^[15]、蛋白质涂渍硅胶填料^[16]、混合功能填料^[17]、屏蔽疏水相填料^[18,19]等多种类型,其中内表面反相限进填料(internal surface reversed-phase restricted-access material, ISRP-RAM)是应用最多的一类限进填料。

目前市售的ISRP-RAM柱价格昂贵,使用成本高,限制了其在应用研究领域的使用。本实验合成制备了能够在线、直接进样分析生物样品的一种新型内表面反相限进填料。通过3-氨丙基三乙氧基硅烷将硅胶表面的硅羟基硅烷化后,再键合上1,6-亚甲基二异氰酸酯,然后在硅胶外表面键合上亲水性的聚乙烯醇,内表面键合上非极性化合物己胺,使其外表面具有亲水性,而内表面具有疏水性;通过元素分析、电镜观察、蛋白质排阻性能考察、反相色谱性能评价对合成的限进填料进行表征,并在该限进填料柱上进行了血浆的直接进样分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱系统:Waters 600 泵、Waters 996 光电二极管阵列检测器(PAD)、Waters 600 控制器、Millennium 32 色谱工作站(美国 Waters 公司);

Vario EL 元素分析仪(德国 Elementar Analysen Systeme 公司); HITACHI S-450 电子显微镜(日本 Hitachi 公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司);超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);TGL-16B 型离心机(上海安亭科学仪器厂)。硅胶(粒径 5 μm , 孔径 9.5 nm, 比表面积 350 m^2/g , 兰州中科安泰分析科技有限责任公司); 3-氨丙基三乙氧基硅烷、1,6-亚甲基二异氰酸酯、聚乙烯醇(相对分子质量(M_r) 86 000)、己胺(美国 Acros Organics 公司)。普蔡洛尔对照品(纯度 99.8%, 批号:100783-200401)、阿替洛尔对照品(纯度 99.6%, 批号:100117-200504)、卡马西平对照品(纯度 99.8%, 批号:100142-200503)、苯巴比妥对照品(纯度 99.5%, 批号:171222-200605)(中国药品生物制品检定所)。甲醇为色谱纯(德国 Merck 公司);水为灭菌注射用水,使用前均经 0.22 μm 微孔滤膜过滤;其余试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 限进填料合成

将硅胶加入干燥的甲苯中加热回流,共沸除去水分。冷却至室温,加入 3-氨丙基三乙氧基硅烷,加热回流。冷却、过滤,分别用甲苯、甲醇和二氯甲烷洗涤,真空干燥,即得 3-氨丙基官能化硅胶(3-aminopropyl functionalized silica, APS)。将 3-氨丙基官能化硅胶加入到干燥的甲苯中,在冰浴下加入 1,6-亚甲基二异氰酸酯。移除冰浴,于 70 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 2 h,冷却至室温,过滤,用干燥的甲苯洗涤。将聚乙烯醇溶于干燥的氯化锂-二甲基亚砷系统中,搅拌下加热到 80 $^{\circ}\text{C}$ 反应 3 h,冷却至室温;将己胺溶于干燥的吡啶中,加入到反应体系中,加热到 70 $^{\circ}\text{C}$ 反应 12 h。冷却后过滤,分别用二甲基亚砷、水、甲醇、乙腈和二氯甲烷洗涤,真空干燥,即得内表面反相限进填料^[20]。

1.2.2 装填

以四氯化碳-环己烷(3:1, v/v)为匀浆液,甲醇为顶替液,在 40 MPa 压力下将 1 g ISRP-RAM 装入不锈钢管(45 mm $\times$ 4.6 mm)中。将色谱柱用水和甲醇反复冲洗后,再用流动相平衡,待基线平稳后进样测定。采用 1,3,5-三叔丁基苯测定死时间,柱温为室温。

1.2.3 对照品储备液的制备

分别精密称取盐酸普蔡洛尔对照品 10 mg 至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀;阿替洛尔对照品 5 mg 至 5 mL 量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀;苯巴

比妥对照品 2 mg 至 2 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀;卡马西平对照品 10 mg 至 10 mL 量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀;即得到各对照品储备液。

1.2.4 普萘洛尔血浆的制备

将所有对照品储备液用相应溶剂稀释成 0.2 g/L 对照品溶液,所有溶液均在 4 ℃ 冰箱中保存备用。空白血浆置于 -4 ℃ 冰箱中冷冻保存,使用前于 37 ℃ 水浴中复溶。取空白血浆样品 450 μL,加入 50 μL 0.2 g/L 普萘洛尔对照品溶液,置于 2 mL 具塞离心试管中,离心(4 000 r/min)5 min,精密吸取上清液置于离心试管中,备用。

2 结果与讨论

2.1 合成条件的优化

合成反应示意图见图 1。由图 1 可看出:硅胶的外表面键合有亲水基团,内表面键合有疏水基团,

从而实现限进填料的除蛋白质与富集被分析物的双重功能。合成时首先将 3-氨丙基三乙氧基硅烷的乙氧基与硅胶内、外表面的硅羟基进行硅烷化反应,通过 -Si-O-Si- 键将氨丙基键合到硅胶内、外表面;然后官能化硅胶上的氨丙基与 1,6-亚甲基二异氰酸酯上的异氰酸酯反应,通过 -NH-CO-NH- 键将 1,6-亚甲基二异氰酸酯键合在官能化硅胶内、外表面; $M_r = 86\ 000$ 的聚乙烯醇因其 M_r 大而不能进入硅胶内孔中,所以聚乙烯醇上的醇羟基只能与官能化硅胶外表面的异氰酸酯键反应;而已胺分子小,可进入硅胶内孔中与官能化硅胶内表面的异氰酸酯键发生反应,通过 -NH-CO-NH- 键将己胺键合到硅胶内表面上;进而实现将聚乙烯醇键合到硅胶外表面,而将己胺只键合到硅胶内表面的合成反应。

由于硅烷化反应对水和氧气十分敏感,3-氨丙基三乙氧基硅烷的 3 个乙氧基不可能全部与硅羟基

图 1 ISRP-RAM 的合成反应示意图

Fig. 1 Synthetic schematic diagram of the ISRP-RAM

反应,未反应的乙氧基在有水存在的条件下可以水解成羟基,因此整个合成实验过程中都要严格控制在水、无氧条件下进行。反应体系中加入过量的 1,6-亚甲基二异氰酸酯的目的在于使单个 1,6-亚甲基二异氰酸酯分子和 APS 上两分子氨基反应形成桥式氨丙基链的副反应最小化。

2.2 元素分析

将主要反应步骤的反应产物进行元素分析,结果见表 1。由 C、H、N 含量结果可看出:自制的 ISRP-RAM 中 C 含量有较大的提高,提示其具有较好的反相色谱保留性能。APS 的 N 含量可证明氨基已引入,ISRP-RAM 中 N 含量的逐步提高说明了己胺与官能化硅胶内表面的异氰酸酯键合反应成功。

表 1 ISRP-RAM 合成反应中的元素分析结果

Table 1 Results of elementary analysis in ISRP-RAM synthetic reaction

Reaction step	C content	H content	N content
Silica gel	0.30	0.144	0.00
Reaction step 1 (APS)	3.91	0.75	1.11
Reaction step 2	5.17	1.06	1.82
Reaction step 3	8.80	1.53	1.94
Reaction step 4 (ISRP-RAM)	9.36	1.65	2.39

2.3 电镜观察

电镜观察自制的 ISRP-RAM 填料,结果如图 2 所示。从图 2 中可以看出:合成后的填料表面基本平坦光滑,无结块现象。

图 2 ISRP-RAM 的电镜观察图 (4000 倍)
Fig. 2 Schematic diagram of ISRP-RAM by electron microscope (4000 multiple)

2.4 蛋白质排阻能力的考察

选择德国 Merck 公司的 LiChrospher ADS C18 柱为参比柱,以水-甲醇(95:5, v/v)为流动相,流速 1.5 mL/min,以空白血浆为样品,进样量 20 μ L,以 280 nm 处蛋白质的紫外吸收峰面积作为评价指标,考察蛋白质相对洗脱率,色谱图见图 3,结果见表 2。

图 3 采用 (a) LiChrospher ADS C18 柱和 (b) 实验室自制 ISRP-RAM 柱分离空白血浆的色谱图
Fig. 3 Chromatograms of a blank plasma separated on (a) a LiChrospher ADS C18 column and (b) a self-made ISRP-RAM column
Chromatographic conditions: mobile phase, water-methanol (95:5, v/v); flow rate, 1.50 mL/min; column temperature, 25 $^{\circ}$ C; detection wavelength, 280 nm.

表 2 蛋白质洗脱率的测定结果

Table 2 Determination results of elution rate of protein

Peak area by LiChrospher ADS C18 column	Peak area by ISRP-RAM	Relative elution rate of protein/%
257676182	236856314	91.92
260112735	223381517	85.88
261459376	237594376	90.87
259841391	226423958	87.14
243741907	209592462	85.99
260034568	234783405	90.30

结果表明:自制的 ISRP-RAM 柱具有较好的蛋白质排阻能力,与德国 Merck 公司的 LiChrospher ADS C18 柱相比,蛋白质相对洗脱率可达到 85% 以上,6 次测定的相对标准偏差 (RSD) 为 3.00%。

2.5 样品富集能力的考察

以 2、4、8、16、32 mg/L 不同质量浓度的普萘洛尔血浆为样品,对自制 ISRP-RAM 柱与传统蛋白质沉淀法的富集能力进行考察。普萘洛尔血浆直接注入 ISRP-RAM 柱,先用磷酸盐缓冲液 (pH 8)-甲醇 (95:5, v/v) 在流速 1.5 mL/min 下除蛋白质,然后用磷酸盐缓冲液 (pH 8)-甲醇 (60:40, v/v) 在线洗脱检测。传统的蛋白质沉淀法操作:精密吸取普萘洛尔血浆 50 μ L,加入碳酸钠溶液 (pH 10) 50 μ L,涡旋混匀,加入甲醇 200 μ L,离心 (10 000 r/min) 5 min,将上清层移至离心管中挥干,残渣中加入无水乙醇 50 μ L 溶解,取溶解液进样检测,每个质量浓度平行处理 5 份样品。样品的平均回收率及 RSD 见表 3。

表 3 ISRP-RAM 与蛋白质沉淀法富集血浆中普萘洛尔的能力考察 (n = 5)

Table 3 Enrichment efficiency investigation of propranolol in plasma by ISRP-RAM and precipitation of protein (n = 5) %				
ρ (Propranolol)/ (mg/L)	ISRP-RAM		Precipitation of protein	
	Recovery	RSD	Recovery	RSD
2	96.38	1.04	83.65	4.27
4	98.15	0.87	85.39	3.46
8	104.02	1.33	90.51	3.08
16	101.61	0.70	88.24	4.52
32	99.79	1.52	89.38	3.93

由实验数据可以看出:ISRP-RAM 柱可快速、简便地实现血浆中被分析物与生物大分子杂质的在线分离,一步完成血浆的检测,避免了繁琐、复杂的前处理过程,而且样品的回收率高,RSD 小;但传统的蛋白质沉淀法,因操作步骤多,同时耗费大量的人力和物力,而其样品回收率仅能达到 85% 以上,RSD 均大于 3%。通过两者富集能力的比较,充分显示了 ISRP-RAM 柱在血浆测定中应用的优越性。

2.6 反相色谱性能的考察

选择普萘洛尔、阿替洛尔、苯巴比妥、卡马西平为溶质探针,分别在水性流动相和反相流动相下考察自制 ISRP-RAM 柱对非极性化合物的保留能力及洗脱情况^[21-23],色谱图见图 4。

在水性流动相下,普萘洛尔、阿替洛尔、苯巴比妥、卡马西平在 25 min 内均未被洗脱,在反相流动相下其保留时间分别为 5.615、4.270、1.103、2.918 min,测得其柱效分别为 3 420、2 997、3 562、3 591 理论塔板/m,说明自制 ISRP-RAM 柱具有良好的反相色谱保留性能。

2.7 普萘洛尔血浆样品的测定

普萘洛尔血浆样品在水性流动相(磷酸盐缓冲液(pH 8)-甲醇(95:5, v/v))下,2 min 内蛋白质即被洗脱下来,而普萘洛尔在 20 min 内未被洗脱出来;在反相色谱流动相(磷酸盐缓冲液(pH 8)-甲醇(40:60, v/v))洗脱下,普萘洛尔在 5.615 min 被洗脱下来(见图 5)。

结果表明:自制 ISRP-RAM 能够洗脱普萘洛尔血浆中的蛋白质等大分子且对小分子的普萘洛尔有较好的保留,可用于普萘洛尔血浆的直接进样分析。

普萘洛尔血浆在流动相甲醇-水比例分别为 70:30、60:40、50:50、40:60、30:70 下,均检测不到普萘洛尔,通过查阅文献,结合实验过程考虑原因在于:普萘洛尔与血浆中蛋白质以结合态存在,在冲洗蛋白质等大分子杂质时普萘洛尔血浆蛋白质结合物被直接洗脱除去,因而检测不到普萘洛尔。考虑到

图 4 自制 ISRP-RAM 的反相色谱性能考察谱图
Fig. 4 HPLC chromatograms of ISRP-RAM for its reversed-phase chromatographic performance

Chromatographic conditions: a. aqueous mobile phase: water-methanol (95:5, v/v) for propranolol, atenolol, phenobarbital, carbamazepine, separately. b. reversed mobile phases: phosphate buffer (pH 8)-methanol (40:60, v/v) for propranolol; methanol-water (70:30, v/v) for atenolol and phenobarbital; methanol-water (80:20, v/v) for carbamazepine. Detection wavelengths: 293 nm for propranolol; 278 nm for atenolol; 210 nm for phenobarbital; 254 nm for carbamazepine. Flow rate: 1.00 mL/min for all of the four solutes.

图 5 普萘洛尔血浆的色谱图
Fig. 5 HPLC chromatograms of propranolol plasma

Chromatographic conditions: a. aqueous mobile phase: phosphate buffer (pH 8)-methanol (95:5, v/v); b. reversed mobile phase: phosphate buffer (pH 8)-methanol (40:60, v/v). Detection wavelengths: a. 280 nm; b. 293 nm. Flow rate: 1.00 mL/min.

普萘洛尔显弱碱性,可以利用具有一定 pH 值的缓冲盐溶液作为流动相,将其游离出来,使其以中性状态存在并进入限进填料内部,而与蛋白质等大分子物质分离。将去除蛋白质的流动相调整为甲醇-磷酸盐缓冲液(pH 8)(5:95, v/v),洗脱流动相调整为甲醇-磷酸盐缓冲液(pH 8)(60:40, v/v),普萘洛尔在 5.615 min 被洗脱下来。

此外,我们将限进填料柱与柱切换技术结合,建立了直接进样的柱切换-高效液相色谱检测大鼠血浆中普萘洛尔两种对映体的分析方法。该方法不需进行样品预处理,可有效地缩短分析时间,减少血样品用量,降低样品预处理过程中的误差,具有操作简便、结果准确、灵敏度高、特异性好等特点^[24]。

2.8 重现性评价

采用磷酸盐缓冲液(pH 8)-甲醇(95:5, v/v)和磷酸盐缓冲液(pH 8)-甲醇(40:60, v/v)反复交替冲洗 ISRP-RAM 柱,经 6 000 倍柱体积流动相冲洗,普萘洛尔、阿替洛尔、苯巴比妥、卡马西平的保留时间和柱效变化不大,实验数据见表 4,说明自制的 ISRP-RAM 柱键合层稳定,色谱保留重现性好。

表 4 ISRP-RAM 重现性评价

Table 4 Reproducibility evaluation of ISRP-RAM

Drug	t_0 /min	Column efficiency/(N/m)
Propranolol	5.623	3398
Atenolol	4.310	2960
Phenobarbital	1.082	3560
Carbamazepine	2.910	3580

t_0 : retention time; N/m: number of theoretical plates per meter.

2.9 耐用性评价

在 ISRP-RAM 柱使用的半年中,经过 500 余次血浆进样(共约 10 mL 血浆)后,再以普萘洛尔血浆作为溶质探针,继续考察 ISRP-RAM 柱的耐用性。从实验数据可知:普萘洛尔血浆在 ISRP-RAM 柱上保留时间为 5.671 min,柱效为 3 300 块/m,柱压从 2.96 MPa(430 psi)上升至 3.10 MPa(450 psi),ISRP-RAM 柱的基本性能保持稳定,表明该柱具有良好的耐用性。

3 结论

本实验根据文献报道和实验室前期大量的工作基础,探索合成了一种新型的内表面反相限进填料。该填料合成方法简单,反应步骤少,同时能显著降低 ISRP-RAM 柱的使用成本,为开展柱切换限进填料-高效液相色谱模式研究药物及其代谢产物提供有力

的支持。此外,本实验中硅胶内、外表面键合的亲水性和疏水性基团也可根据实际样品需求选择许多其他化合物,从而制备高选择性的内表面反相限进填料,这些新填料在快速、在线分析生物样品中具有十分广阔的应用前景。

参考文献:

[1] Fang P C, Jia Z P, Ma J, et al. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (樊鹏程, 贾正平, 马骏, 等. 药物分析杂志), 2008, 28(2): 329

[2] Cai Y Q, Mou S F. Chinese Journal of Analytical Chemistry (蔡亚岐, 牟世芬. 分析化学), 2005, 33(11): 1647

[3] Yang P, Wang R, Ma J, et al. Analytical Instrumentation (杨沛, 王荣, 马骏, 等. 分析仪器), 2011(3): 1

[4] Sadllek P, Satlinsky D, Solich P. Trends Anal Chem, 2007, 26(5): 375

[5] Mullett W M. J Biochem Bioph Meth, 2007, 70(2): 263

[6] Boppana V K, Miller-Stein C, Schaefer W H. J Chromatogr A, 1996, 678(2): 227

[7] Chiao P, Rbeida O, Christaens B, et al. J Chromatogr A, 2002, 975(1): 145

[8] Willemsen O, Machtejevas E, Unger K. J Chromatogr A, 2004, 1025(2): 209

[9] Rbeida O, Christaens B, Chiap P, et al. J Pharm Biomed Anal, 2003, 32(4/5): 829

[10] Hu L H, Boos K S, Ye M L, et al. J Chromatogr A, 2009, 1216: 5377

[11] Rbeida O, Christaens B, Hubert P, et al. J Chromatogr A, 2004, 1030(1/2): 95

[12] Boos K S, Grimm C H. Trends Anal Chem, 1999, 18(3): 175

[13] Weimann A, Bojesen G. J Chromatogr B, 1999, 721(1): 47

[14] Van Warde A, Anthonio R L, Visser T J, et al. J Chromatogr B, 1995, 663(2): 361

[15] Yu Z, Westerlund D, Boos K S. J Chromatogr B, 1997, 704(1/2): 53

[16] Hermansson J, Grahn A. J Chromatogr A, 1994, 660(1/2): 119

[17] Lee H M, Choi S J, Jeong C K. J Chromatogr B, 1999, 727(1/2): 213

[18] Uno K, Maeda I J. J Chromatogr B, 1995, 663(1): 177

[19] Nimura N, Itoh H, Kinoshita T. J Chromatogr A, 1995, 689(2): 203

[20] Gasparrini F, Cioqli A, D'Acquarica I, et al. J Chromatogr A, 2007, 1176: 79

[21] Wang L J, Yang G L, Li X, et al. Chinese Journal of Chromatography (王利娟, 杨更亮, 李煦, 等. 色谱), 2005, 23(5): 504

[22] Dai Y K, Peng J D, Chang X J. Acta Chimica Sinica (代永矿, 彭敬东, 常晓娟. 化学学报), 2010, 68(2): 169

[23] Li L S, Liu X, Huang Z B, et al. Chinese Journal of Chromatography (李来生, 刘旭, 黄志兵, 等. 色谱), 2005, 23(2): 123

[24] Wu X Y, Wang R, Xie H, et al. Chinese Journal of Chromatography (武晓玉, 王荣, 谢华, 等. 色谱), 2011, 12(29): 1205